

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-510863

(43)公表日 平成9年(1997)11月4日

(51)Int.Cl.  
C 12 M 1/00識別記号  
7804-4BF I  
C 12 M 1/00

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁)

(21)出願番号 特願平7-512207  
 (22)出願日 平成6年(1994)10月20日  
 (85)翻訳文提出日 平成8年(1996)4月22日  
 (86)国際出願番号 PCT/US94/12023  
 (87)国際公開番号 WO95/11294  
 (87)国際公開日 平成7年(1995)4月27日  
 (31)優先権主張番号 139,540  
 (32)優先日 1993年10月20日  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
 C, NL, PT, SE), CA, JP, US

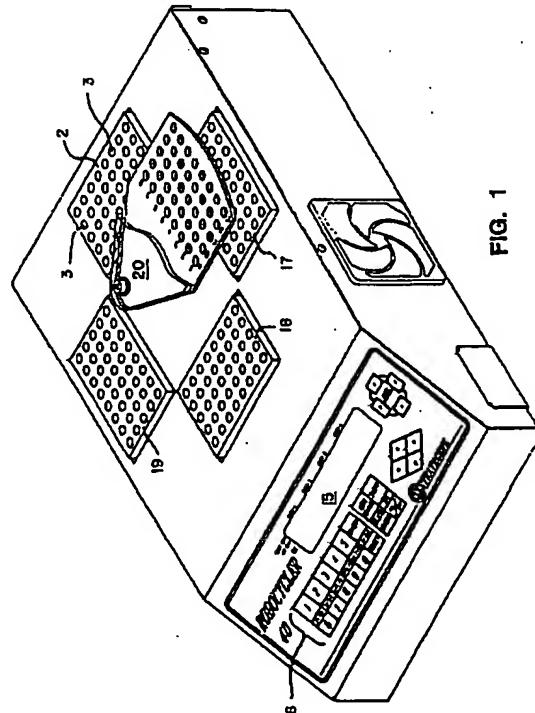
(71)出願人 ストラッタジーン  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
 92037、ラ・ホイア、ノース・トリー・バ  
 インズ・ロード 11099  
 (72)発明者 ダンサート、ジョン・エル  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
 92131、サン・ディエゴ、カミニト・ドハ  
 9735  
 (72)発明者 ショーブス、ロバート・ジェイ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
 92102、サン・ディエゴ、トゥエンティエ  
 イット・ストリート 1639  
 (74)代理人 弁理士 山崎 行造 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 温度勾配ブロックを含む熱サイクル装置

## (57)【要約】

PCRおよびその他の反応に対する最適温度をより効率的に特定することができる効率的手段を提供する。勾配ブロックを横切って温度を発生する方法であり、さらに、ブロック(2, 17, 18, 19)を有し、それを横切って温度勾配を発生させることができる装置である。そのような温度勾配を形成することによって、勾配ブロック(2, 17, 18, 19)上のウエル(3)に保持された多数の反応混合物をわずかずつ異なる温度で行うことができ、これにより、最適な温度を迅速に確定することができる。望ましい実施例においては、勾配ブロック(2, 17, 18, 19)は核酸増幅反応に用いられる温度サイクル装置に組み立てられている。



**【特許請求の範囲】**

- 1 温度勾配ブロックを含む装置において複数の反応混合物を同時に反応させるための方法において、前記勾配ブロックが、最上部分、第一と第二の対向部分、および最低部分を有し、前記複数の反応混合物ウェルが、前記ブロックにおいて前記対向部分の間に形成され、前記方法が、前記勾配ブロックにおける複数の反応ウェルに反応混合物を入れる段階、および前記勾配ブロックにわたり前記対向部分の間に温度勾配を生成する段階よりなることを特徴とする方法。
- 2 請求項1の方法において、前記温度勾配生成段階が、勾配ブロックの第一対向部分を加熱する段階よりなることを特徴とする方法。
- 3 請求項2の方法において、前記温度勾配生成段階が、勾配ブロックの第二対向部分を冷却する段階よりなることを特徴とする方法。
- 4 請求項1の方法において、さらに、前記温度勾配を制御手段を使用して制御する段階を含むことを特徴とする方法。
- 5 請求項4の方法において、前記制御段階が、温度設定値と前記ウェルからの実際の温度データを比較する段階よりなることを特徴とする方法。
- 6 請求項3の方法において、前記制御手段がマイクロプロセッサよりなることを特徴とする方法。
- 7 請求項1の方法において、前記装置が、さらに、最上部分、第一と第二の対向部分、および最低部分を有する少なくとも1個の補助熱伝導ブロック、ならびに前記補助ブロックの前記対向部分に形成される複数の反応混合物ウェルよりなり、この方法がさらに、前記反応混合物を前記勾配ブロックと前記補助ブロックの間で移動する段階よりなることを特徴とする方法。
- 8 少なくとも1個の熱伝導ブロックよりなる熱サイクル装置を使用して反応混合物を自動的に温度サイクルさせるための方法において、前記ブロックが第一と第二の対向部分の間でその最上面に間隔を付けて配置される複数の試料ウェルを有し、またこの方法は、反応混合物を前記ウェルに入れること、および前記第一対向部分を加熱することにより前記ブロックにわたり前記対向部分の間に温度勾配を生成することよりなることを特徴とする方法。

- 9 請求項 8 の方法において、さらに第二対向手段を冷却する段階よりなることを特徴とする方法。
- 10 热伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記装置が、反応混合物保持装置およびブロックヒータよりなり、前記反応混合物保持装置は、最上部分、第一と第二対向部分、および最低部分を有する熱伝導ブロック、ならびに前記最上部分の前記第一と第二の対向部分の間に形成される複数の反応混合物ウェルよりなり、前記ブロックヒータは、前記第一対向部分に隣接して位置することを特徴とする装置。
- 11 請求項 10 の装置において、前記第二対向部分に隣接して位置するブロッククーラよりなることを特徴とする装置。
- 12 請求項 10 の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記装置がさらに、前記ブロックヒータを制御するための制御手段よりなることを特徴とする装置。
- 13 請求項 12 の装置において、この制御手段により制御される冷却ブロックよりなることを特徴とする装置。
- 14 請求項 10 の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記熱伝導ブロックが黄銅よりなることを特徴とする装置。
- 15 請求項 12 の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記制御手段が温度の設定値と実際の温度データを比較するためのマイクロプロセッサよりなることを特徴とする装置。
- 16 請求項 10 の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記熱伝導ブロックにおける前記複数のウェルが、前記最上部分にわたり間隔を付けて配置されることを特徴とする装置。
- 17 請求項 16 の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記熱伝導ブロックにおける前記複数のウェルが、前記最上部分にわたり平行な直線上の列に間隔を付けて配置されることを特徴とする装置。
- 18 請求項 10 の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記保持装置がさらに、前記最低部分に隣接して位置するヒータよりなることを特徴とする装置。

- 19 反応混合物を保持するための保持手段よりなる熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置であつて、前記保持手段が、(i)最上部分、第一と第二の対向部分、および最低部分を有する熱伝導ブロック、ならびに前記最上部分において前記第一と第二の対向部分の間に形成される複数の反応混合物ウェル、および(ii)前記熱伝導ブロックにわたり前記第一と第二の対向部分の間に温度勾配を生成するための手段よりなることを特徴とする装置。
- 20 請求項19の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、温度勾配を生成するための前記手段が、前記ブロックの前記第一対向部分を加熱するための手段よりなることを特徴とする装置。
- 21 請求項20の装置において、前記ブロックの前記第二対向部分を冷却するための手段よりなることを特徴とする装置。
- 22 請求項19の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記装置がさらに、反応混合物を保持するための少なくとも1個の補助保持手段よりなり、前記補助保持手段が、(i)複数の反応混合物ウェルを含む少なくとも1個の補助熱伝導ブロック、および(ii)前記補助熱伝導ブロックを加熱するための手段よりなることを特徴とする装置。
- 23 請求項19の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記熱伝導ブロックが、黄銅よりなることを特徴とする装置。
- 24 請求項19の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記熱伝導ブロックにおける前記複数のウェルが、前記ブロックにわたり平行な直線上の列に間隔を付けて配置されることを特徴とする装置。
- 25 請求項19の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記装置がさらに、前記温度勾配を生成するための制御装置手段によりなることを特徴とする装置。
- 26 請求項25の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記制御装置手段が、温度設定値と実際の温度データを比較するためのマイクロプロセッサよりなることを特徴とする装置。
- 27 請求項19の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記保持装置手段がさらに、前記最低部分を加熱するための加熱手段より

なる

ことを特徴とする装置。

28 請求項22の熱伝導ブロックにわたり温度勾配を生成するための装置において、前記装置がさらに、前記反応混合物を前記保持手段の間で移動するためのロボットアーム制御手段により制御されるロボットアーム手段よりなることを特徴とする装置。

29 分子生物学的反応を実施するための装置において、前記装置が、少なくとも1個の温度制御されるブロックおよびブロックヒータよりなり、前記ブロックが、第一と第二の対向部分の間でその最上部分に間隔を付けて配置される複数の反応混合物ウェルを有し、前記ブロックヒータが、前記第一の対向部分に隣接して位置し、前記第一と第二の対向部分の間に温度勾配を生成することができる特徴とする装置。

## 【発明の詳細な説明】

### 温度勾配ブロックを含む熱サイクル装置

#### 発明の分野

本願発明は、核酸増幅、DNA塩基逐次反応などを実施するために有用な温度サイクル装置において、一定のブロックにわたり温度勾配を生成することができ、試料ウェルを含む単一または多重加熱ブロックおよび／または冷却ブロックを含むことができる温度サイクル装置に関する。

#### 発明の背景

希望する生成物を生成するための多重またはサイクル式化学反応を必要とするシステムは、最適な結果を得るために慎重な温度制御を必要とすることが多い。このような反応は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびリガーゼ連鎖反応（LCR）のような核酸増幅反応を含む。この理由で、このような増幅反応が実施される反応容器の温度を正確に制御できる装置が開発されてきた。

例えば、先行技術においてDNA増幅および塩基逐次反応に対して多数の熱「サイクル装置」が使用されており、そこでは1個以上の温度制御されるエレメント、すなわち「ブロック」が反応混合物を保持し、ブロックの温度は期間を通じて変更される。

他の先行技術システムは、温度制御される多重ブロックが種々の希望温度に維持され、また反応混合物をブロックからブロックに移動するためにロボットアームが利用される温度サイクル装置により代表される。

これらのシステムはすべて、種々のプロセス（例えば、変性、アニーリング、および拡張）を、これらの段階に対する最適温度が一度決定されれば、効率的に実施することができるよう、使用者がブロックに対する期間中の温度または温度プロファイルを計器上でプログラムすることができる機能を含んでいる。しかし、重要なことは、如何なる反応システムにおいても、種々の段階の各々、特にアニーリング段階を含む核酸増幅またはインキュベーションに対する最適温度の決定は単純な作業ではない。

PCRは、一定のポリヌクレオチド塩基配列の等比級数的増幅を1サイクル毎に

1回完了させる結果になる多重サイクルを含む技術である。PCRの技術は、分子生物学の技術における平均的熟練者に良く知られている。PCRの技術は、PCR:A Practical Approach (PCR: 実際的方法) 、 M.J. McPherson等、 IRL Press(1991) 、 PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (方法と応用に対する指針) 、 Innis等著、 Academic Press(1991) 、 およびPCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (PCR技術: DNA 増幅に対する主要事項と応用) 、 H.A. Erlich、 Stockton Press(1989) を含む多くの書籍において記載されている。PCRは、ここに引例として収録されたU.S.Pat. Nos.4,683,195 ; 4,683,202 ; 4,800,159 ; 4,965,188 ; 4889,818 ; 5,075,216 ; 5,079,352 ; 5,104,792 ; 5,023,171 ; 5,091,310 ; および5,066,584を含む多くの米国特許にも記載されている。

PCR技術は、標準として、ポリヌクレオチドの変性段階と、それに続くその変性ポリヌクレオチドに対する少なくとも一対のプライマーオリゴヌクレオチドのアニーリング段階、すなわち、変性ヌクレオチドテンプレートに対するプライマーのハイブリダイジングを含む。アニーリング段階の後に、ポリメラーゼ活性を有する酵素が、プライマーオリゴヌクレオチドを組み合わせ、合成テンプレートとして最初の変性ポリヌクレオチドを使用する新しいポリヌクレオチド鎖の合成を触媒する。この一連の段階（変性、プライマーのアニーリング、およびプライマーの拡張）が、PCRサイクルを構成する。サイクルが繰り返されると、以前のサイクルにより新しく合成されたポリヌクレオチドが以降のサイクルにおける合成に対するテンプレートとして作用することができるので、新しく合成されるポリヌクレオチドの量が等比級数的に増加する。プライマーオリゴヌクレオチドは、標準として、2箇所のアニーリングサイトの間の領域が増幅されるように、一定の二重鎖ポリヌクレオチド塩基配列の対向鎖にアニールすることができる対として選択される。

反応混合物の温度は、一つのPCRサイクルの間に変化させる必要があり、従つて、多重サイクルのPCR実験の間には多数回変化させる必要がある。例えば、DNAの変性は標準として約90-95°Cで行われ、プライマーの変性DNAへのアニーリン

グは標準として約40-60℃で実施され、そしてアニールされたプライマーのポリメラーゼによる拡張段階は標準として約70-75℃で実施される。これらの段階は各々希望する結果を得るための最適温度を有する。各段階に対する最適温度を決定するためには、多くの実験が必要である。

例えば、DNA変性は一般に90-95℃の間であるが、DNAの長さおよび存在する4種のデオキシヌクレオチド（グアニン・シトシンの対およびアデニン・チミンの対）の各々の割合により、特定の必要温度に若干の変化が観察される。変性段階の間の加熱が不十分であることは、PCR反応が不全になる一般的な理由である。

しかし、変性段階の間の過熱は、ポリメラーゼの過剰な変性の結果になり得る。

PCRアニーリング段階に対して、最適温度を達成することはさらに重大である。低過ぎるアニーリング温度は、非特定のDNA断片が増幅される結果になる。アニーリング温度が高過ぎると、プライマーがアニールする効率が下がり、希望する生成物の収率を減少し、恐らくは純度を低下させる結果になる。アニーリング段階においては、最適温度は、プライマーの長さおよび存在する4種のデオキシヌクレオチド（グアニン・シトシンの対およびアデニン・チミンの対）の各々の割合を含む多くの要素により変化する。約50%のグアニン・シトシンよりなる標準の20塩基のオリゴヌクレオチドのプライマーに対しては、55℃の温度が温度範囲の下端として適切な推定である。しかし、より大きいプライマー特性を得るためにプライマーの長さを増加すると、異なるアニーリング温度が必要になる場合がある。このように、最適アニーリング温度に及ぼす微妙な影響要素の数は、一定のシステムに対する最適条件を迅速に特定する作業を困難にする。

拡張反応に対して最適温度を達成することも、希望するPCRの結果を得るために重要である。温度は、拡張反応の速度と正確度の両方に影響し得る。もしポリメラーゼ反応の速度が低過ぎると、新しく合成されるポリヌクレオチドがプライマーアニーリングに対するサイトを含まないことがある。さらに、増幅に対する変性ポリヌクレオチド塩基配列は、選択された温度により形成または消滅する1個以上の二次構造の領域を含むことがある。さらに、ポリメラーゼ活性を有するいくつかの異なる酵素がPCRに対して使用されることがある。各酵素は、活性、安定性および正確度に対してそれぞれの最適温度を有する。

特定のPCRに対する最適の変性、アニーリング、および拡張温度の決定は、その最適条件が反応の各々に対して異なるという事実により複雑である。このように、3個の最適温度範囲を決定するためには、3番目の温度変数を変えながら2個の温度変数を一定に維持する多くの個別の実験を実行する必要がある。その結果、PCRシステムを実行するための最適温度の決定は、時間が掛かる作業になり得る。

従って、本願発明の目的は、PCR およびその他の反応に対する最適温度をより効率的に特定することができる効率的手段を提供することにある。

### 発明の概要

この目的を達成するために、本願発明は、「勾配」ブロックにわたって温度勾配が生成される方法である。本願発明はまた、ブロックにわたって温度勾配を生成することができるブロックよりなる装置を含む。このような勾配を設定することにより、多重反応混合物を、僅かに異なる温度で同時に操作することができ、それにより一定の反応に対する最適温度を迅速に特定することができる。本願発明の最も好ましい形態においては、勾配ブロックが熱サイクル装置と組み合わされる。そうすることにより、最適反応温度を特定すれば、直ちにこの熱サイクル装置を使用して一連の希望する反応を実行することが可能である。

第一の形態においては、本願発明は、温度勾配ブロックを含む装置において複数の反応混合物を同時に反応させるための方法であり、この方法は、反応混合物を勾配ブロックにおける複数の反応ウェルに入れる段階、および前記勾配ブロックにわたり対向部分の間に温度勾配を生成する段階とからなり、この勾配ブロックは最上部分、第一と第二の対向部分、および最低部分を有し、この複数の反応混合物ウェルは、このブロックにおける対向部分の間に形成される。

この形態においては、温度勾配を生成する段階は、勾配ブロックの第一の対向部分を加熱する段階と、勾配ブロックの第二の対向部分を冷却する段階よりなる。この方法はまた、制御手段を使用して温度勾配を制御する段階を含み得る。制御手段を使用することにより、この方法はさらに、温度の設定値とウェルからの実際の温度データを収集および記憶し、この情報をマイクロプロセッサに送信する段階を含み得る。

本願発明の方法の他の形態においては、この方法における装置はさらに、最上部分、第一と第二の対向部分、および最低部分を有する少なくとも1個の補助熱伝導ブロック、ならびにこの補助ブロックの対向部分の間に形成される複数の反応混合物ウェルよりなり、この方法はさらに、反応混合物を勾配ブロックと1個以上の補助ブロックの間で移動する段階よりなる。

他の形態においては、この方法は、少なくとも1個の熱伝導ブロックよりなる装置を使用し、このブロックは第一と第二の対向部分の間でその最上面において間隔を付けて配置される複数の試料ウェルを有し、またこの方法は、反応混合物をウェルに入れること、そして第一の対向部分を加熱し、第二の対向部分を冷却することにより、ブロックにわたり対向部分間に温度勾配を生成させることからなる。

本願発明はまた、反応混合物ホルダ、ブロックヒータ、およびブロッククーラよりなる装置を含み、この反応混合物ホルダは、最上部分、第一と第二の対向部分、および最低部分、ならびに最上部分の第一と第二の対向部分の間に形成される複数の反応混合物ウェルよりなり、このブロックヒータは、第一対向部分に隣接して位置し、そしてこのブロッククーラは、第二対向部分に隣接して位置する。

他の形態においては、本願発明の装置は、反応混合物を保持するための保持手段、および熱伝導ブロックにわたり第一と第二の対向部分の間に温度勾配を生成するための手段よりなり、この保持手段は、最上部分、第一と第二の対向部分および最低部分、ならびに前記最上部分の第一と第二対向部分の間に形成される複数の反応混合物ウェルを有する熱伝導ブロックを含む。

さらに他の形態においては、本願発明は、少なくとも1個の温度制御されるブロックおよびブロックヒータよりなる分子生物学的反応を実施するための装置を含み、このブロックは、第一と第二の対向部分の間でその最上部分に間隔を置いて配置される複数の反応混合物ウェルを有し、そしてこのブロックヒータは、第一の対向部分に隣接して位置し、第一と第二の対向部分の間に温度勾配を生成することができる。

好みしい形態においては、熱伝導ブロック、すなわち「勾配」ブロックは、実

質的に黄銅製であるか、または黄銅よりなる。

本願発明の装置は、補助エレメントを含むことができる。このように、特に好ましい形態においては、この装置は、勾配ブロックと共に2個以上の熱伝導ブロックを含む。この装置はまた、勾配ブロックにわたり温度勾配を制御するための制御装置を含むことができ、また多重ブロック装置においては、この制御装置は均等な温度に加熱または冷却されるブロックの温度も制御することができる。好ましくは、この制御装置は、温度設定値と実際の温度データを収集し記憶するためのマイクロプロセッサ、およびウェルからの実際の温度データを収集し、この情報をマイクロプロセッサに送信するための多数の温度センサを含む。

他の形態においては、勾配ブロックにおける複数のウェルは、平行な直線上の列に形成される。さらに、2個以上のブロックが含まれる場合は、この装置は、試料をプログラマブルに制御可能な方法によりブロックの間を移動させるためのロボットアームを含むことができる。

#### 図面の簡単な説明

本願発明は、下記の添付図面を参照すればさらによく理解されるであろう。

図1は、本願発明の熱勾配ブロックを組み入れた熱サイクル装置の斜視図である。

図2は、本願発明に記載される熱勾配ブロック、周辺のヒータとクーラの斜視分解図である。

図3は、本願発明の熱勾配装置と方法が使用される熱サイクル装置の要素を示すブロック線図である。

#### 発明の詳細な説明

本願発明は、一連の実験を、極めて同一に近い温度で同時に実施することを可能にするPCR反応用の周知の熱サイクル装置におけるブロックのようなブロックにわたり熱勾配を生成するための装置および方法に関する。ここに使用されている「ブロック」なる用語は、温度制御が可能で、反応混合物すなわち「試料」を入れる容器を受けるようにウェルが配列されている通常金属の構造物を言う。ここに使用される「勾配ブロック」なる熟語は、このようなブロックを説明するこ

とを意図するが、但し、勾配ブロックは、ブロックにわたり温度勾配を確立することができるブロックである。このような温度勾配が確立できる特定の方法の実

施例がここで論じられるが、この技術における熟練者は、勾配ブロックを有することによる優位性が一度分かれば、ここに示す装置の他の多くの変形を容易に同一と見なし得ることを理解するであろう。

本願発明に対する利用の特定の分野の一つは、多重ブロック熱サイクル装置におけるものである。本願発明の勾配ブロックを多重ブロック熱サイクル装置に組み合わせることにより、反応が進行する温度が勾配ブロックにわたり変化する一連の反応を同時に実施することが可能である。これにより、特定の反応に対する最適温度の迅速な決定が可能である。

図1は、本願発明に記載される熱勾配ブロック2が組み合わされた従来技術の本出願人の装置を示す。

図1においては、図2および図3にさらに詳細が示されるサイクル装置の種々の構成要素、すなわち、ディスプレイ15、キーパッド16、補助ブロック17、18、および19、ならびにロボットアーム20（断面図で示す）を見ることができる。

周知の通り、マイクロプロセッサをこの装置の制御電子装置に組み込むことができることは理解されるであろう。このマイクロプロセッサは、温度勾配の範囲を制御するためと、熱勾配ブロックに出入りする試料の移動をプログラムするために使用することができる。このマイクロプロセッサは、キーボードを通じて使用者の入力を集め、この入力を実際の温度と比較し、加熱または冷却装置を必要に応じて入れるかまたは切るためのソフトウェアに書き込まれたコマンドを実行する。この電子装置にはまた、マイクロプロセッサによる読み取り可能なタイマーを含む。これにより、マイクロプロセッサは、反応混合物が一定のブロックにある経過時間を比較し、それを使用者による希望時間入力と比較することができる。

このマイクロプロセッサはまた、2台のステップモータを使用してアームが操作されるロボットアームを制御する。1台のモータはアームを上下し、他の1台

はアームをブロックからブロックに回転する。

このように、この技術における熟練者は、本願発明の熱勾配ブロックをどのように周知の熱サイクル装置に組み込むことができるかを容易に理解することができる。

勿論、本願発明の熱勾配ブロックは、有利に使用されるためには必ずしも周知のサイクル装置に組み込まれるものに限定されるものではない。例えば、熱勾配ブロックを組み込んだ独立の装置は、最適反応温度を特定することができ、従つてこれらのサイクル装置に使用することができるよう、周知のサイクル装置と共に使用することができるであろう。

図2は、勾配ブロックアセンブリの構成要素の分解図を示す。このように、図2においては、勾配ブロック装置は総括的に参考番号1により指示されている。この装置は、反応混合物を保持するための多数のウェル3、またはこの混合物を保持することができる容器を組み込んだ熱伝導ブロック2よりなる。ブロック2の一部には、ヒータ5が開口部4に取り付けられる。ヒータ5は、一般に入手できる円筒形のカートリッジタイプの抵抗式ヒータ（商品名 RAMA、San Jacinto, California）である。

希望する温度範囲により、ブロック2の対向部分は、リブ付きのアルミニウムブロック7とファン9により構成される吸熱装置を使用して同時に冷却することができる。当然、吸熱装置が操作されると否とにからず、ブロックの対向部分の間に温度勾配が生成される。しかし、温度勾配をさらに大きくすべき場合は、吸熱装置を操作することができる。勾配を生成し維持するための能力を高めるために、ブロック2は、ブロックにわたる温度勾配を生成するために必要な熱流束量を減らすために、熱伝導率が比較的小さい材料で構成することが好ましい。黄銅が好ましい。

多重ブロックシステムが使用される場合（図1）は、勾配ブロック以外のブロックは熱伝導率が比較的高い材料で構成される。そうすることにより、これらのブロックは均等な温度まで加熱または冷却することができるが、一定の温度を維持するために過剰な加熱または冷却を必要とする程には十分な熱伝導性はない。

先行技術においては、このような用途に対してアルミニウムが知られている。

勾配ブロックの大きさ、およびヒータと吸熱装置の加熱および冷却能力に応じて、ブロック2にわたり1°C以上22°Cまで、好ましくは1°Cから14°Cまでの温度勾配に達することができる。穴6は、ブロックにおける平行で直線上の列のウェル

を同一温度にする傾向がある熱伝導を制限するために、ブロック2を開けることができる。この穴を使用すると、勾配ブロックにわたり、ある列のウェルから次の列までの温度プロファイルを直線的にすることもできる。

この技術においては、周知のヒータとクーラを使用することができる。例えば、ペルチエ熱電装置が使用できるが、その他の受動または能動ヒータ（例えば、冷却または加熱された液体または気体）も有用であろう。

図1と図2の両方に示すように、勾配ブロック2は、ブロックにわたり等間隔に配置される試料ウェル3を8列から12列まで有することが好ましい。各列は、5から8個の試料ウェルを含むことができる。0.2または0.5 mlのチューブを使用することができる。試料ウェルの特定の数および構造は、希望される場合は能力を修正するために変更することができる。もし、7°Cから11°Cまでの温度勾配がブロックの高温部分と低温部分の間に生成される場合は、試料ウェルの各列は約1°Cずつの温度差がある。

図2に戻ると、このシステムをこの技術で周知のブロックと同じ方法、すなわち、ブロック2の長さと幅の全体にわたり均等な加熱により操作することができるよう、補助ヒータ8および10も使用することができる。ヒータ8および10は、薄箔型（商品名 MINCO、Minneapolis、Minnesota）であることが好ましい。ヒータ8および10は、システムを始動するとき、またはブロック2が操作されるべき温度範囲が上昇される場合に、できる限り迅速にブロック2を少なくとも冷却部分温度にするために、ヒータ5と共に使用することもできる。

ワイヤコネクタ11、12、および13は、ヒータを電源に接続する。装置1はさらに、望ましい安全機構である高温遮断器として使用することができるサーモスタット14を含めることができる。

図3のブロック線図は、多数の加熱と冷却ブロックを有する熱サイクル装置に

組み合わされたブロック2として図2に示される種類の（「第二ブロック」と表示される）勾配ブロックを示す。図3における表示は自明であり、図2により示されている装置は、非勾配ブロックの代わりに勾配ブロックが置き換えられている点だけが周知の熱サイクル装置と異なる。PCRに対しては、図3における第一、第二および第三のブロックは、約25℃から99℃までの間の温度範囲に維持される

ようにプログラムすることができ、それぞれ変性、アニーリングおよび拡張用に使用される。第四のブロックは、一般に4℃から25℃の間に維持され、例えば、PCR反応が終了した後に試料の保管用に使用される。黄銅製である第二ブロックは、アニーリング段階用に使用される。

図3で分かるように、ブロックに沿った温度を慎重に監視することができ、制御電子装置とディスプレイに情報を戻すために使用できるように、勾配ブロックの長さに沿って2個以上のサーモカップルを使用することができる。

下記の実施例は、主題である本願発明を説明する目的で示されるもので、これに限定するためのものではない。

#### 実施例1

##### ポリメラーゼ連鎖反応用の勾配熱サイクル装置の使用

本願発明の熱勾配システムの高温プライマー伸長試験が、2つのモデルプライマー／テンプレートシステムを使用して実施された。これらの2つのシステムは、伸長プロセスの間に使用されたアニーリング温度に応じて、伸長生成物の収率を著しく変化させ得ることを示す。プライマー／テンプレートの#1セットはヒトゴシエ遺伝子の105 bp領域を増幅し、一方#2セットはヒトフコシダーゼ遺伝子の540 bp領域を増幅する。本願発明の熱勾配システムは、42℃から56℃までの最適アニーリング温度範囲を使用してプライマーの伸長ができる勾配ブロックを含む。

#### 方法と材料

本願発明の勾配ブロックを使用して、プライマー伸長反応が実施された。プライマー／テンプレート試験#1セットは、ヒトゲノムDNAテンプレートと2個の22m

erオリゴマーよりなり、105 bp伸長生成物を得た。プライマーAの塩基配列は5' CCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGG 3' (SEQ ID NO:1) であった。プライマーBの塩基配列は 5' GGTTTAGCACCACCAACAGC 3' (SEQ ID NO:2) であった。プライマー/テンプレート試験#2セットは、ヒトゲノムDNAテンプレートとそれぞれ20個と30個の塩基の2個のオリゴマーよりなり、540 bpの伸長生成物を得た。プライマーAの塩基配列は 5' AGTCAGGTATCTTGACAGT 3' (SEQ ID NO:3) であった。プライマーBの塩基配列は 5' AAGCTTCAGGAAACAGTGAGCAGCGCCTC 3' (SEQ ID NO:4) であった。

プライマー伸長反応混合物は、 $100 \mu\text{l}$ 反応容積中の 1X Taq DNA ポリメラーゼバッファー (10 mM tris-HCl pH 8.8、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、.001% (w/v) ゼラチン) 、dNTP各 250 μM、プライマーおよびテンプレート各 250 ng、ならびに Taq DNAポリメラーゼ 2.5単位よりなるものであった。この反応混合物は、又クレアーゼを含まない無菌の鉱油  $50 \mu\text{l}$ によりオーバーレイされた。

使用された温度サイクリングパラメータは下記の通りであった：

1 分	94°C		
1 分	42-56°C (勾配ブロック)		
1 分	72°C		
1 分	94°C		30 サイクル
1 分	42-56°C (勾配ブロック)		
8 分	72°C		
保管	4°C		

プライマー/テンプレート1セット当たり8個、すなわち、勾配温度ブロックスロット1個当たり1個の反応混合物が試験された。使用されたアニーリング温度は、42、44、46、48、50、52、54および56°C (勾配ブロックにわたり2°C刻み) であった。反応は $500 \mu\text{l}$ のチューブで実施された。

### 結果

プライマー/テンプレートのセット1とセット2の両者は、勾配温度ブロックで使用されたアニーリング温度に応じて、明らかに異なる結果を得た。#1セット

からのプライマー伸長生成物は、(56℃のアニーリング温度を使用する伸長反応により得られた) 105 bpのサイズの希望する単一DNAバンドから、48℃のアニーリング温度を使用する反応により、多様な大きさ(大凡 180、280および800 bpのサイズ)の異質DNA伸長生成物を得る反応混合物に変化した。#2セットからのプライマー伸長生成物は、(42℃のアニーリング温度を使用する伸長反応により得られた) 540 bpの大きさの希望する単一DNAバンドから、56℃のアニーリング温度を使用する反応により、約2000 bpの異質DNA伸長生成物を得る反応混合物に

変化した。

### 実施例 2

#### リガーゼ連鎖反応用の勾配熱サイクル装置の使用

リガーゼ連鎖反応(LCR)は、痕跡レベルの周知の核酸塩基配列を検出するために使用することができる最近明らかにされたDNA増幅技術である。LCRは、DNA熱サイクル装置で実施されるサイクル的2段階反応を含む。第一段階は、二重鎖DNAがほどけて单一鎖になる高温融解段階である。第二段階は、2組の隣接する相補オリゴヌクレオチドがアニールして单一鎖の目標DNA分子になり、DNALリガーゼ酵素により結合される冷却段階である。1サイクルからの結合生成物は、次のサイクルの結合反応に対するテンプレートとして作用する。このように、LCRは、結合生成物が指數関数的に増幅される結果になる。

#### 材料および方法

この実験で使用された材料は、Stratagene, La Jolla, Californiaから入手された。オリゴヌクレオチドがDNA目標分子にアニールされるLCRサイクルの第二段階に対する最適温度は、本願発明の勾配熱サイクル装置の使用により、実験的に決定された。2組の反応が設定され、その1組はオリゴヌクレオチドが相補される野生型のテンプレートを有し、他の1組は1個の塩基転移により野生型テンプレートDNA塩基配列とは異なる突然変異型テンプレートを有する。この実験で使用されたDNAテンプレートは、pBlusecriptIIベクターおよびlac I因子を含むプラスミド構造体であった。野生型のテンプレートは、正常なlac I塩基配列を含み、突然変異型テンプレートは挿入体内の191サイトにCからTまでの塩基転移型

突然変異を含んでいた。4個のオリゴヌクレオチドプローブは、各々2個のオリゴヌクレオチド2対よりなるものであった。第一のセットAおよびBは、相互に隣接し、目標DNAの一本鎖を相補していた。第二のセットCおよびDは、第一のセットを相補し、従って、目標DNAの第二鎖における隣接サイトを占めていた。このオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列(5'から3'まで)は下記の通りであった：

A: TTGTGCCACG CGGTTGGAA TGTA (SEQ ID NO:5)  
 B: AGCAACGACT GTTTGCCCGC CAGTTC (SEQ ID NO:6)  
 C: TACATTCCCA ACCGCGTGGC ACAAC (SEQ ID NO:7)  
 D: AACTGGCGGG CAAACAGTCG TTGT (SEQ ID NO:8)

オリゴヌクレオチドプローブAおよびDは、合成の間に5'一磷酸化された。

野生型lac I挿入体の塩基配列は、下記のように、この挿入体のサイト161で始まった。

5' CTGAATTACA TTCCCAACCG CGTGGCACAA CAACTGGCGG GCAAACAGTC GTTGCTGATT  
 3' (SEQ ID NO:9)

この突然変異塩基配列は、サイト191におけるCからTまでの塩基転移により野生型と異なる。

LCR実験は下記の通り実施された：500- $\mu$ lの無菌10XZ Pfu LCRバッファー中で、以下の各成分、すなわち、無菌dH<sub>2</sub>O 15 $\mu$ l、オリゴヌクレオチド混合物1 $\mu$ l(各10 ng)、野生型または突然変異型プラスミドテンプレートまたは非テンプレートの何れか1 $\mu$ l(100 pg)、およびPfu DNA1)ガーゼ酵素1 $\mu$ l(4U)を混合した。無菌鉱油オーバーレイ25- $\mu$ lがチューブに添加された。この手順は、野生型テンプレート反応混合物または突然変異型テンプレート反応混合物の何れかが各々合計5本のチューブになるように繰り返された。これらのチューブは、本願発明の勾配熱サイクル装置の位置1、3、5、7および8に置かれ、それにより、その装置の各等温カラムにおいて、野生型と突然変異型のテンプレート反応が行われた。この装置は、92℃の高温と56℃と70℃の間で温度が変化する勾配プロックの間でサイクルするようにプログラムされた。この装置は、4分間高温プロックに、次に3分間勾配プロックに移動し、次に25回高温プロックと勾配プロック

の間で移動し、各ブロックで1分間停止するようにプログラムされた。結合連鎖反応の生成物は、TBEでバッファーされた6%ポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動と、次に臭化エシジウムによる染色と、紫外光のもとでの写真により可視化された。

### 結果

野生型テンプレート反応は、勾配ブロックの最低温度(56°C)部分に対応する位置8で最も強い正の信号を発生した。本願発明の勾配熱サイクル装置の使用により、1回の実験でこの反応に対する最適なアニーリング温度の実験的決定が可能であった。

熱勾配ブロックには、そのブロックまたは関連する構造体に有利に組み合わせることができる多くの改造型および変更型が存在する。さらに、試料を自動的に種々のブロックの間に移動し、これにより多くの温度において多数の反応を操作することができる多重ブロック熱サイクル装置の2基以上のブロックとして、多重熱勾配ブロックを使用することができる。

本願発明は、PCRにおけるその使用に関連して詳細に記載されてきた。しかしそれ操作における個々の段階に対する最適温度の決定に対して極めて有用であるこの他に、本願発明は、他の多くの化学反応に対する最適温度の決定に対してもまた有用である。これらの他の化学反応には、リガーゼ連鎖反応(LCR)およびDNAサイクル塩基逐次反応のようなPCRアニーリング段階に類似したアニーリング段階を採用する非-PCR核酸増幅を含む。本願発明が有用である他の種類の反応には、DNA塩基逐次反応、サイクル的反応を使用するcDNA合成、連結増幅塩基逐次反応(CAS)、cDNA末端の急速増幅(RACE)、および多数の温度でインキュベーションを行う必要があるその他のインキュベーション反応を含む。

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Dansgaert, John L.  
Shepes, Robert J.  
Shoemaker, Daniel D.

(ii) TITLE OF INVENTION: Thermal Cycler Including a Temperature Gradient Block

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 9

## (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Pennie and Edmonds  
(B) STREET: 1155 Avenue of the Americas  
(C) CITY: New York  
(D) STATE: New York  
(E) COUNTRY: U.S.A.  
(F) ZIP: 10036

## (v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

## (vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:  
(B) FILING DATE:  
(C) CLASSIFICATION:

## (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Halluin, Albert P.  
(B) REGISTRATION NUMBER: 25,227  
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 8142-078

## (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 415-854-3660  
(B) TELEFAX: 415-854-3694

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 22 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: unknown  
(D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

CCTGAGGGCT CCCAGAGACT GG

22

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 22 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: unknown
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

GGTTTACGCAC GACCACAACA GC

22

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: unknown
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

AGTCAGGTAT CTTTGACAGT

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: unknown
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

AAGCTTCAGG AAAACAGTGA GCAGCGCCTC

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: unknown
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

TGTGCCACG CGGTGGAA TGTA

24

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: unknown
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

AGCAACGACT GTTGCCGC CAGTC

26

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 25 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: unknown
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

TACATCCCCA ACCGGCGTGGC ACAAC

25

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: unknown
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

AACTGGCGGG CAAACAGTCG TNGT

24

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 60 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: unknown
- (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

CTGAATTACA TTCCCAACCG CCTGGCGACAA CAACTGGCGG GCAAACAGTC CTTGCTGATT

60

【図1】

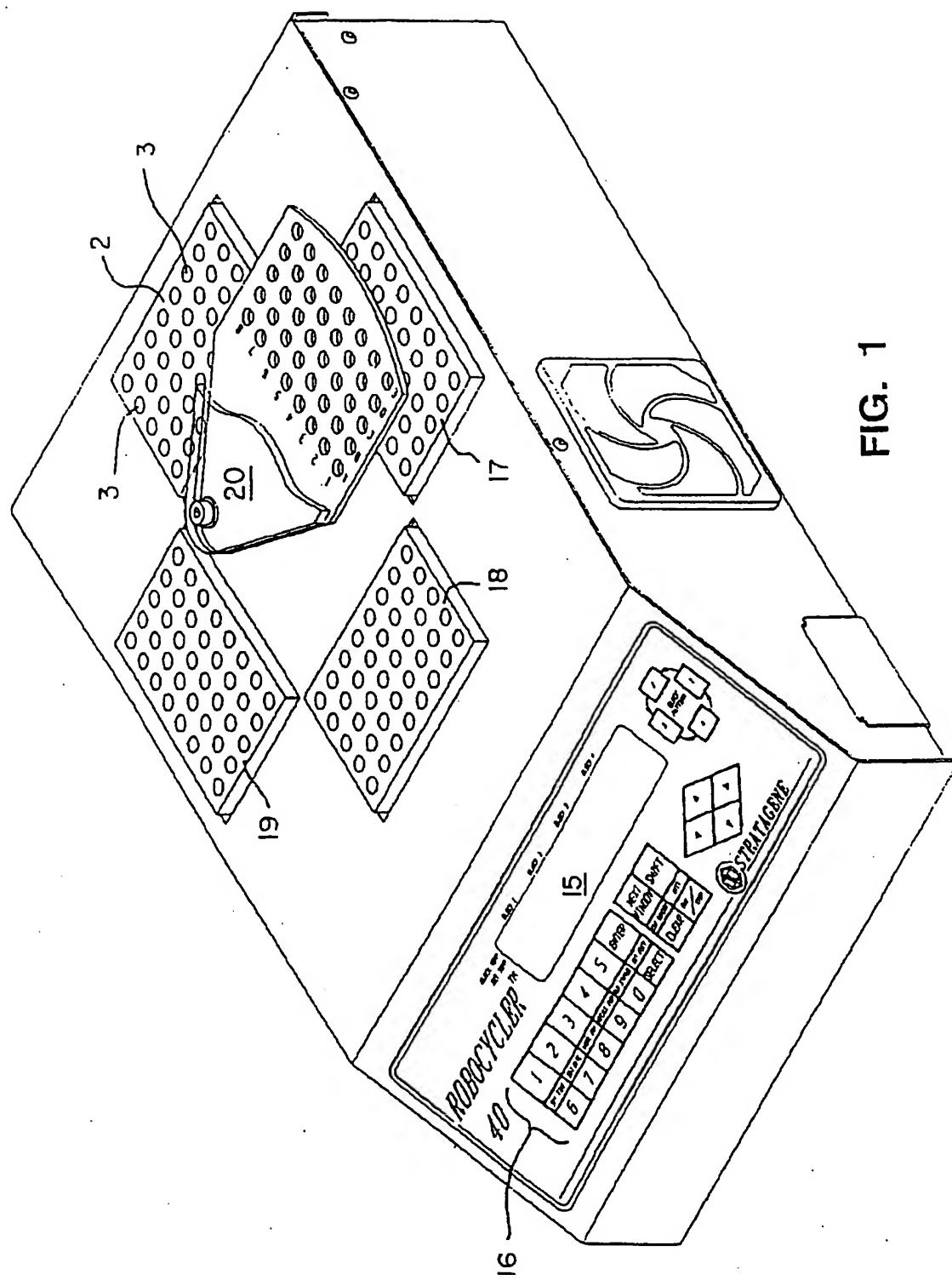


FIG. 1

【図2】

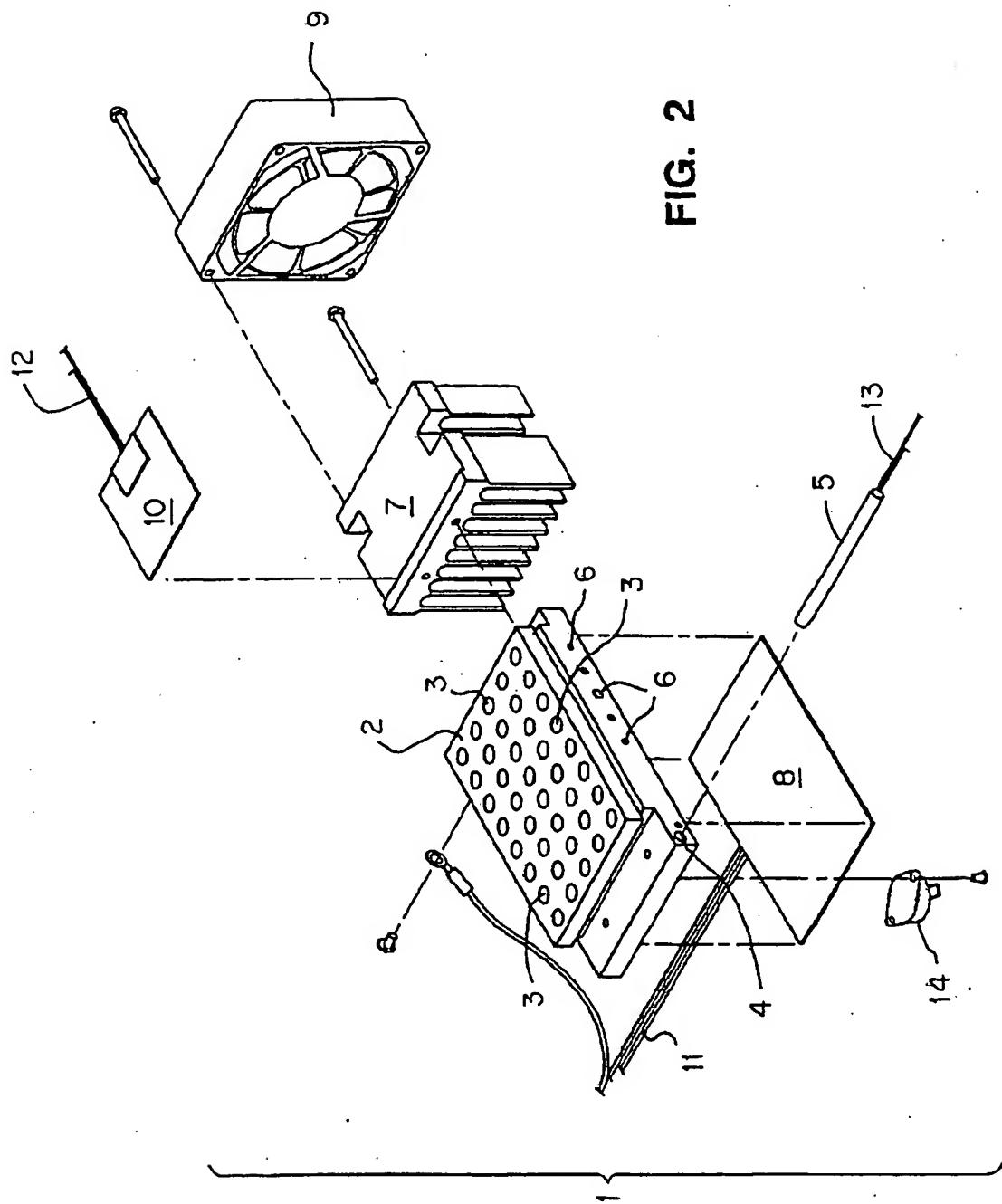


FIG. 2

【図3】

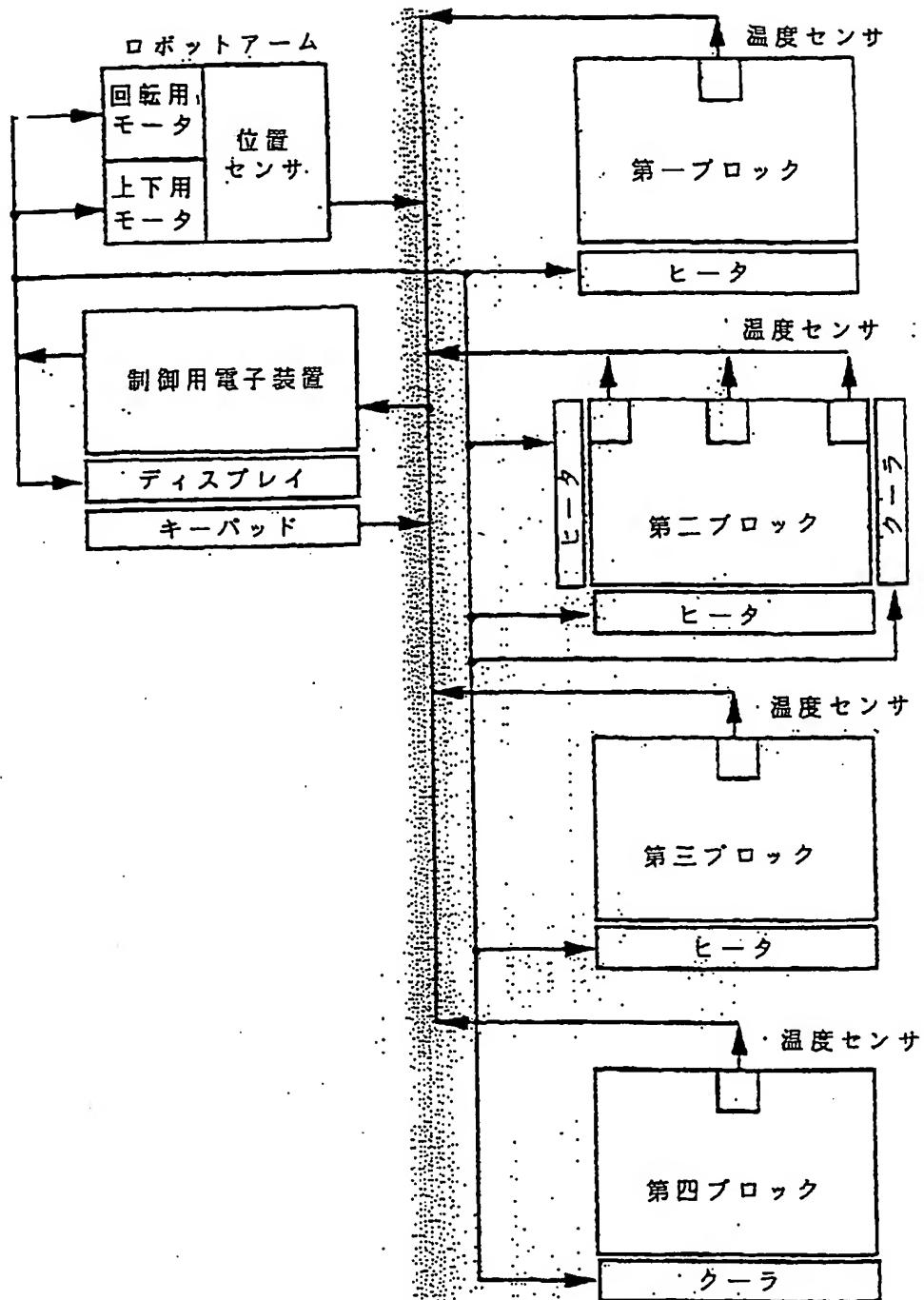


FIG. 3

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US94/12023
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(6) :C12M 1/38 US CL :165/14, 26, 30; 422/50, 68.1, 99, 104, 109; 435/290, 316, 809 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  U.S. : 165/14, 26, 30; 422/50, 68.1, 99, 104, 109; 435/290, 316, 809		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P -- Y	US, A, 5,255,976 (CONNELLY) 26 October 1993, see entire document.	1-4, 6, 8-14, 17-25, 27-29  5, 7, 15, 16, 26
X -- Y	US, A, 3,801,467, (NOBE et al.) 02 April 1974, see entire document.	1-4, 6, 8-14, 17-25, 27-29  5, 7, 15, 16, 26
Y	TwinBlock Thermalcycler Advertisement, BioTech, Volume 14, No. 1, issued January 1993.	5, 15, 26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier documents published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other events "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  20 DECEMBER 1994	Date of mailing of the international search report  1-20-95	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer JAN M. LUDLOW <i>J. M. Ludlow</i> Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/12013

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,981,801 (SUZUKI et al.) 01 January 1991, figures 7-8.	7, 16

---

フロントページの続き

(72)発明者 シューメイカー、ダニエル・ディー  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
94305、スタンフォード、エスコンディー  
ドウ・ビレッジ(番地なし)、エイブラームズ・アパートメント・7シー